

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

04.07.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年 7月 4日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-195315  
[ST. 10/C]: [JP2002-195315]

出 願 人  
Applicant(s): 三菱ウェルファーマ株式会社

REC'D 22 AUG 2003

WIPO PCT

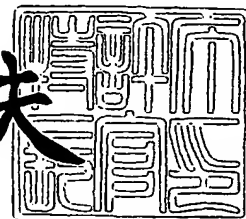
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 IR02003

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/49

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都西東京市中町 5 丁目 1 7 番 2 号

    【氏名】 橋本 謙二

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県千葉市花見川区幕張本郷 7 丁目 2 1 番 1 5 号

    【氏名】 伊豫 雅臣

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都文京区千石 2 丁目 2 7 番 6 号 小石川苑 2 0 6 号

    【氏名】 福島 健

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都世田谷区代田 6 丁目 1 5 番 1 8 号

    【氏名】 今井 一洋

【特許出願人】

    【識別番号】 000006725

    【氏名又は名称】 三菱ウェルファーマ株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100082511

    【氏名又は名称】 高柳 昌生

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 013114

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 要約書 1

    【包括委任状番号】 0114651

【プルーフの要否】

要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 精神分裂病の診断方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 血清中の D 型セリンおよび L 型セリンの濃度を測定し、濃度の増減を指標とすることを特徴とする精神分裂病の診断方法。

【請求項 2】 血清中の D 型セリン濃度を測定し、濃度の減少を指標とすることを特徴とする精神分裂病の診断方法。

【請求項 3】 血清中の L 型セリン濃度を測定し、濃度の増加を指標とすることを特徴とする精神分裂病の診断方法。

【請求項 4】 血清中の D 型セリン濃度が低く、L 型セリン濃度が高いことを特徴とする精神分裂病モデル動物。

【請求項 5】 遺伝子改変技術を用いて、セリンラセマーゼ活性を低下させた動物を作成する方法。

【請求項 6】 遺伝子改変技術を用いて、セリンラセマーゼ活性を低下させた精神分裂病モデル動物。

【請求項 7】 所定の被験物質の中から、抗精神分裂病薬の候補物質をスクリーニングする方法であって、

—請求項 6 のモデル動物に前記被験物質を投与する工程と

—当該モデル動物の血清中の D 型セリン濃度を測定し、D 型セリンが増加しているか否かを判定する工程

とを具備する方法。

【請求項 8】 所定の被験物質の中から、抗精神分裂病薬の候補物質をスクリーニングする方法であって、

—請求項 6 のモデル動物に前記被験物質を投与する工程と

—当該モデル動物の血清中の L 型セリン濃度を測定し、L 型セリンが減少しているか否かを判定する工程

とを具備する方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、精神分裂病の診断方法に関する。さらに詳しくは血清中のD型セリンおよびL型セリンの量を測定することを特徴とする精神分裂病の診断方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

精神分裂病は、人口の約1%の割合で起こり、思春期から20代の若い時期に発症する。症状としては、幻覚、妄想などの陽性症状、感情鈍麻、意欲減退、社会的引きこもりなどの陰性症状、および認知機能障害などがある。病態の特殊性から早期診断、治療、社会復帰活動、再発予防といった包括的な治療体系の確立が望まれている。精神分裂病の治療には、薬物治療が不可欠であり、フェノチアジン系化合物、ブチロフェノン系化合物、ベンズアミド系化合物、イミノジベンジル系化合物、チエピン系化合物、インドール系化合物およびセロトニン・ドーパミン受容体遮断薬などが投与されている。

精神分裂病の病態には、遺伝的要因および環境要因が関与していることが知られている。フェンサイクリジン、ケタミンなどのNMDA受容体遮断薬によって精神分裂病と酷似した症状が引き起こされることが知られており、いわゆる「精神分裂病のグルタミン酸機能低下仮説」が提唱されている。現在のところ、精神分裂病を診断する生物学的マーカーが無い。血液や尿などの患者のサンプルを用いた研究が数多く行なわれてきたが、未だに確立されたものは無い。

【0003】

ところで、D型アミノ酸は、哺乳類には存在しないと思われていたが、近年、D型セリンを含むD型アミノ酸がヒトを含む哺乳類にも低濃度で存在することが明らかになってきた。一方、D型セリンは、興奮性の神経伝達を司るグルタミン酸受容体のサブタイプNMDA受容体のグリシン部位のアゴニストとして作用することが知られている。精神分裂病のグルタミン酸機能低下仮説に基づくと、D型セリンが精神分裂病の病態に関与している可能性がある。

したがって、精神分裂病患者の治療のためにD型セリンを投与する方法（米国特許第6162827）や、精神分裂病、アルツハイマー病、自閉症、鬱病など

の神経精神疾患の治療に、NMDA受容体のグリシン部位のアゴニストであるD型セリン、D型アラニン等を投与する方法が知られている（WO99/52519）。

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

精神分裂病による入院患者は日本における病院の総ベッド数の約15%を占め、医療経済という点からも問題は大きい。医療の現場から精神分裂病を早期に診断するような診断薬および診断方法の開発が望まれている。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行なった結果、精神分裂病患者の血清中のD型セリンおよびL型セリンのレベルが、健常者のそれと比較して有意に変化していることを見出した。

特に、本発明者らは、NMDA受容体アゴニスト活性を有するD型セリンが分裂病患者抹消血で有意に減少していることを初めて発見した。これまでセリン（totalセリン、99%がL型セリン）が分裂病患者抹消血中で増加しているという報告はあったが、今回totalセリン、L型セリン、D型セリンそれぞれを測定したところ、totalセリンはやはり分裂病患者で増加（ $P=0.017$ ）、L型セリンも同様に増加（ $P=0.012$ ）していたのに対し、D型セリンは分裂病患者で減少（ $P=0.001$ ）しており、D型セリン/totalセリンの比も患者で明らかに減少（ $P=0.0001$ ）していることが判明した。D型セリンの減少と、患者の病態（陰性、陽性など）、薬物治療の有無、薬剤投与背景などとの明確な相関は見られなかったが、ただ薬物治療群でのみ解析した際に、D型セリンとBPRSスコア（Brief Psychiatric Rating Scale、このスコアが低いほど改善度が高い）に関してむしろ正の相関がみられた。D型セリンの減少に関してはD型セリンの合成酵素セリンラセマーゼ、D型セリントランスポーターの関与が考えられる。

#### 【0006】

本発明は、上記の知見に基づいて完成されたものである。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 血清中のD型セリンおよびL型セリンの濃度を測定し、濃度の増減を指標とすることを特徴とする精神分裂病の診断方法。

(2) 血清中のD型セリン濃度を測定し、濃度の減少を指標とすることを特徴とする精神分裂病の診断方法。

(3) 血清中のL型セリン濃度を測定し、濃度の増加を指標とすることを特徴とする精神分裂病の診断方法。

(4) 血清中のD型セリン濃度が低く、L型セリン濃度が高いことを特徴とする精神分裂病モデル動物。

(5) 遺伝子改変技術を用いて、セリンラセマーゼ活性を低下させた動物を作成する方法。

(6) 遺伝子改変技術を用いて、セリンラセマーゼ活性を低下させた精神分裂病モデル動物。

(7) 所定の被験物質の中から、抗精神分裂病薬の候補物質をスクリーニングする方法であって、

一前記第(6)項のモデル動物に前記被験物質を投与する工程と

一当該モデル動物の血清中のD型セリン濃度を測定し、D型セリンが増加しているか否かを判定する工程

とを具備する方法。

(8) 所定の被験物質の中から、抗精神分裂病薬の候補物質をスクリーニングする方法であって、

一前記第(6)項のモデル動物に前記被験物質を投与する工程と

一当該モデル動物の血清中のL型セリン濃度を測定し、L型セリンが減少しているか否かを判定する工程

とを具備する方法。

#### 【0007】

#### 【発明の実施の形態】

本発明による精神分裂病の診断は、例えば次のようにして行なうことができる。ヒトの血液から血清を調製し、血清中のD型セリンおよびL型セリンの濃度を種々の方法により定量する。望ましくは蛍光標識したセリンの誘導体を高速液体

クロマトグラフィーを用いて検出・定量する。精神分裂病患者の血清中のD型セリン濃度および／またはtotalセリンに対するD型セリンの濃度比が、健常者の値より有意に低いことを利用し、精神分裂病を診断する。

#### 【0008】

血清中のD型およびL型セリンを測定する具体的な方法としては、例えば4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F)などの蛍光標識体による誘導体(NBD標識セリン)を合成する工程；

NBD標識セリンを高速液体クロマトグラフィーで分離・定量する工程；

分取したNBD標識セリンを光学分割用カラムを用いて分離・定量する工程；  
からなる方法がある。

本発明の診断方法は、従来の主観的診断方法と併用することもできる。また、何らかの方法によって、確定的に精神分裂病であることが明らかな患者から、本発明の診断方法において指標として使用し得るD型セリン、L型セリンの定量値についてのデータを収集することによって、本発明の診断方法のみによって確定的な判定を下すことも可能となる。

#### 【0009】

また、本発明の診断方法は、法的責任能力の有無を調べる目的で、又はその他の目的で行われる精神鑑定に適用することも可能である。

本発明方法は、また「抗精神分裂病薬の候補物質」の判定にも有用である。すなわち、D型セリンを増加させる作用あるいはL型セリンを減少させる作用を有する化合物は、抗精神分裂病薬として有用である可能性がある。「抗精神分裂病薬の候補物質」は、試験者が所望する任意の物質であり得る。

また、D型セリン濃度が低く、L型セリン濃度が高いモデル動物は、精神分裂病のモデルとしても有用である。すなわち、遺伝子改変技術を用いて、D型セリンの合成酵素であるセリンラセマーゼを低下させた動物を作成することにより、モデル動物の作成が可能である。「精神分裂病モデル動物」にはマウス、ラットおよびサルが含まれるが、ヒト以外の動物であれば、任意の動物がモデル動物になり得る。

#### 【0010】



このモデル動物を利用することにより、新しい抗精神分裂病薬のスクリーニングも行なうことが可能である。抗精神分裂病薬の候補物質をスクリーニングする方法としては、

—上記のモデル動物に被験物質を投与する工程と、

—当該モデル動物の血清中のD型セリンまたはL型セリン濃度を測定し、D型セリンが増加しているか否か、あるいはL型セリンが減少しているか否かを判定する工程からなる方法が挙げられる。

さらに、このようなモデル動物に、抗精神分裂病薬の候補物質を投与した後、血清中のD型セリンが増加および／またはL型セリンが減少し、かつ精神分裂病が治癒又は改善されていれば、前記候補物質は抗精神分裂病作用を有していると判断し得る。すなわち、本発明の診断方法を応用すれば、抗精神分裂病薬の候補物質を容易且つ正確にスクリーニングすることができる。

#### 【0011】

以上のように、本発明の方法は、ヒトを除く精神分裂病のモデル動物の有用性を判定する方法、およびこのようなモデル動物を用いた薬物スクリーニングにおいて、薬物の有効性を判定する方法に応用し得る。

精神分裂病モデル動物の有用性を判定するには、前記診断方法と同様に、D型セリンの低下および／またはL型セリンの増加を確認し、さらに被験動物が精神分裂病を発症しているか否かを診断し、該動物が精神分裂病を発症していれば、精神分裂病のモデル動物として有用であると判定する。

#### 【0012】

##### 【実施例】

以下、試験例により、本発明をさらに詳細に説明するが、いかなる意味においても本発明の範囲を限定するものではない。

#### 【0013】

##### 試験例1

健常者42名および精神分裂病患者42名より血液を採取した後、通常の方法で血清を分離し、以下の試験に供した。すべての患者はDSM-IVに従って診断され、専門医によるBPRSスコア判定が行われた。被験者の背景は表1に示し

た通りである。

【0014】

#### 試験方法

ヒト血清20 $\mu$ Lにメタノール180 $\mu$ Lを加えて、除タンパク後、遠心し、この上清20 $\mu$ Lに0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.0)、50mM NBD-Fを加えた後、60℃で1分間加温した。これに0.1%トリフルオロ酢酸含有の水/アセトニトリル混液(90/10)200 $\mu$ Lを加えた。この溶液10 $\mu$ LをHPLCに注入した。

HPLCには、ODSカラム(TSKgel ODS-80Ts)とキラルカラム(Sumichiral 0A-2500(S))を6方バルブで接続したカラムスイッチングHPLCを使用した。これは、ODSカラムにてNBD-(D+L)-セリンを分離定量し、続いてキラルカラムでNBD-D-セリンとNBD-L-セリンを分離するものである。

これにより、ヒト血清中のD型セリンならびにL型セリンを定量した。

#### 結果

健常者群と精神分裂病群において、ヒト血清中のD型セリンおよびL型セリンの含量を高速液体クロマトグラフィーにて測定し、濃度を算出した。その結果を表1に示す。

【0015】

【表1】

	健常者群 n=42, M/F=21/21 mean±S. D.	精神分裂病群 n=42, M/F=22/20 mean±S. D.	P value
年齢	35.5±14.4(20-70)	36.0±14.7(16-75)	0.932
発病年		25.3±11.6(13-57)	
罹患期間(年)		10.2±11.0(0-41)	
BPRS スコア			
Total		23.1±14.5(2-58)	0.017
Positive		13.3±9.85(2-37)	
Negative		5.12±4.02(0-16)	
Total Serine (μmol/L)	177.3±30.7	199.7±46.6	
D-Serine (μmol/L)	2.28±0.59	1.86±0.53	0.001
L-Serine (μmol/L)	175.0±30.6	197.9±46.4	0.013
Ratio (%)			
D-Serine/Total Serine	1.34±0.34	0.95±0.26	<0.0001

【0016】

精神分裂病群では、D型セリンのレベルは、平均1.86 μmol/L、健常者では、D型セリンのレベルは、平均2.28 μmol/Lであった。この2群間の値をノンパラメトリック・マンホイットニ・Uテストで解析した結果、精神分裂病患者で有意 ( $z = -4.78$ ,  $p = 0.001$ ) に減少していることが判った。また、未治療の患者と治療中の患者においてD型セリン濃度の有意な変化は認められなかった。さらに、治療中の患者においてもクロルプロマジン換算で統計解析した結果、D型セリン濃度と相関していないこと、さらに罹病期間とも相関していないことが判った。精神分裂病群では、L型セリンのレベルは、平均197.9 μmol/L、健常者では、L型セリンのレベルは、平均175.0 μmol/Lであった。この2群間の値をノンパラメトリック・マンホイットニ・Uテストで解析した結果、精神分裂病患者で有意 ( $z = -2.49$ ,  $p = 0.013$ ) に増加していることが判った。精神分裂病群では、全セリンに対するD型セリンの割合は、平均0.95%、健常者では、全セリンに対するD型セリンの割合は、平均1.34%であった。この2群間の値をノンパラメトリック・マンホイットニ・Uテス

トで解析した結果、精神分裂病患者で有意 ( $z = -4.78$ ,  $p < 0.0001$ ) に減少していることが判った。

【0017】

【発明の効果】

本発明の方法を用いれば、血清中のD型セリン、L型セリンの濃度を指標とすることにより、被験者が精神分裂病に罹患しているか否かを客観的に診断することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 医療の現場から精神分裂病を早期に診断するような診断薬および診断方法の開発が望まれている。

【解決手段】 D型セリンおよびL型セリンの血中濃度を測定することを特徴とする精神分裂病の診断方法であって、高速液体クロマトグラフィーなどの分析技術を用いて血清中のD型セリンおよびL型セリンの濃度を測定することによって、精神分裂病が診断される。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-195315
受付番号	50200977761
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成14年 7月 5日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 7月 4日

次頁無

特願 2002-195315

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000006725]

1. 変更年月日

2001年10月 1日

[変更理由]

名称変更

住 所

大阪府大阪市中央区平野町2丁目6番9号

氏 名

三菱ウェルファーマ株式会社

2. 変更年月日

2001年10月 1日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府大阪市中央区平野町2丁目6番9号

氏 名

三菱ウェルファーマ株式会社